ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

ANNÉE 1971 — N° 101

La contraction musculaire rôles et techniques de mise en évidence des adénosines triphosphatases

THESE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Présentée et soutenue publiquement en décembre 1971

DEVANT

L'UNIVERSITÉ PAUL-SABATIER DE TOULOUSE

PAR

RUHAUT Bernard, André

né le 13 février 1947 à PARIS (15e)

Jury :

Président — M. GUILHEM, Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Assesseurs — M. VAN HAVERBEKE Prof. à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

M. CABANIE, Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

TOULOUSE

IMPRIMERIE DU VIGUIER

6, rue Ninau, 6

—

1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536510_0056

La contraction musculaire, roles et techniques de mise en évidence des adenosines triphosphatases

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

ANNÉE 1971 — N° 101

La contraction musculaire rôles et techniques de mise en évidence des adénosines triphosphatases

THESE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Présentée et soutenue publiquement en décembre 1971

DEVANT

L'UNIVERSITÉ PAUL-SABATIER DE TOULOUSE

PAR

RUHAUT Bernard, André

né le 13 février 1947 à PARIS (15e)

Jury :

Président — M. GUILHEM, Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Assesseurs — M. VAN HAVERBEKE Prof. à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

M. CABANIE, Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

TOULOUSE

IMPRIMERIE DU VIGUIER

6, rue Ninau, 6

—

1971

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur ..... M. FLORIO
Directeurs Honoraires .. MM. PONS
DARRASPEN

Proresseur Honoraire: M. LOMBARD

PERSONNEL ENSEIGNANT

Chaire de Pharmacie et Toxicologie :

Professeur titulaire ..... M. GODFRAIN
Maître-Assistant ..... Mme BURGAT-SACAZE

Pharmacie et Toxicologie

Chaire de Physique et Chimie Biologiques et Médicales :

Professeur titulaire ..... M. RICO

Physique biologique et médicale
Chimie biologique et médicale

Chaire d'Anatomie des Animaux Domestiques :

Professeur titulaire ..... M. PAVAUX

Anatomie descriptive - Extérieur
Anatomie appliquée - Tératologie

Chaire de Physiologie et Thérapeutique :

Professeur titulaire ..... M. RUCKEBUSCH
Maître-Assistant Agrégé .. M. FARGEAS

Physiologie - Thérapeutique et Pharmacodynamie

Chaire d'Histologie - Anatomie Pathologique :

Professeur titulaire ..... M. VAN HAVERBEKE
Maître de Conférences, non chef de Service, Prof. sans Chaire ..... M. CABANIE
Maître-Assistant . ... M. MAGNOL

Histologie - Embryologie - Anatomie Pathologique

Chaire d'Hygiène et Industrie des Aliments d'origine animale :

Professeur titulaire ..... M. LABIE
Maître-Assistant ..... M. EECKHOUTTE

Hygiène, Inspection, Contrôle et Technologie des denrées alimentaires d'origine animale

Chaire de Parasitologie et Maladies Parasitaires :

Professeur titulaire ..... M. BRIZARD
Maître-Assistant Agrégé .. M. DORCHIES

Zoologie appliquée - Parasitologie externe
Parasitologie interne - Clinique

Chaire de Sémiologie et Pathologie Médicale des Equidés et Carnivores :

Professeur titulaire ..... M. FLORIO
Maître de Conférences, non Chef de Service, Prof. sans Chaire ..... M. LESCURE
Maître-Assistant ..... M. GUELFI

Sémiologie et Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores - Législation Vétérinaire et Déontologie Clinique

Chaire de Pathologie Médicale du Bétail et des animaux de basse-cour :

Professeur titulaire ..... M. TOURNUT
Maître de Conférences, non chef de Service, Prof. sans Chaire ..... M. ESPINASSE
Maître-Assistant .... M. BEZILLE

Sémiologie et Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour - Clinique
Clinique ambulatoire

Chaire de Pathologie Chirurgicale :

Professeur titulaire ..... M. CAZIEUX

Propédeutique et Sémiologie chirurgicale
Technique chirurgicale - Pathologie chirurgicale
Podologie - Clinique

Chaire de Pathologie de la Reproduction :

Professeur titulaire ..... M. BERTHELON
Maître de Conférences, non Chef de Service, Prof. sans chaire ..... M. ROYAL

Sémiologie et propédeutique
Pathologie de la Reproduction
Obstétrique - Clinique

Chaire de Maladies Contagieuses - Zoonoses - Législation Sanitaire :

Professeur titulaire ..... M. SAURAT
Maître-Assistant Agrégé... M. CHANTAL

Maladies Contagieuses - Zoonoses
Législation Sanitaire

Chaire de Pathologie Générale - Microbiologie - Immunologie :

Professeur titulaire ..... M. LAUTIE
Maître-Assistant ..... M. MEIGNIER

Microbiologie - Immunologie
Pathologie Générale

Chaire de Zootechnie et Economie Rurale :

Professeur titulaire ..... M. QUEINNEC
Maître-Assistant ..... M. DARRE

Ethnologie - Génétique appliquée - Hygiène Générale
Zootechnie - Elevage - Economie Générale et des productions animales

Chaire d'Alimentation :

Professeur titulaire ..... M. FALIU
Maître-Assistant Agrégé .. M. GRIESS

Botanique appliquée et Bromatologie
Agronomie - Alimentation

COURS COMPLEMENTAIRES
CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Antibiothérapie des Maladies infectieuses ..... M. MONNIER
Aspect médical des Zoonoses ..... M. ARMENGAUD
Energétique ..... M. LABOUCHE
Initiation à l'informatique biomédicale ..... M. FERNET
Agronomie ..... M. COMBRET
Métabolismes ..... M. RAYNAUD

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats (Délibération de la Faculté, en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole, en date du 13 juin 1924)

UNIV. LEIDEN BIBL.

A MES PARENTS

A DANIÈLE

A TOUS MES AMIS

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR GUILHEM

de l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommages respectueux.

A NOTRE JURY DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. VAN HAVERBEKE

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui nous a inspiré le sujet de cette thèse et nous a guidé dans l'élaboration de ce travail.

Hommages respectueux.

MONSIEUR LE PROFESSEUR CABANIÉ

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui nous a manifesté sa haute bienveillance en participant à notre jury de thèse.

Puisse-t-il trouver ici l'humble témoignage de notre reconnaissance.

A TOUS NOS MAITRES
DE L'ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE
DE TOULOUSE

A MONSIEUR JEAN LEMAY

A MONSIEUR BRUNO MOUGIN

PLAN

Introduction.

Chapitre premier :

Morphologie musculaire.
Biochimie des filaments.
Innervation.

1. Morphologie musculaire :

Histogenèse.
Structure.

2. Biochimie des myofilaments.

3. Innervation motrice du muscle.

Chapitre II :

Mécanisme de la contraction musculaire.

Chapitre III :

Source d'énergie de la contraction musculaire.

Chapitre IV :

Les différents types de fibres musculaires.

Chapitre V : *Rôle des ATPases.*

ATPases du réticulum sarcoplasmique.
ATPases des mitochondries.
ATPases myofibrillaires.

Chapitre VI :

Phénomène de relaxation.

Chapitre VII :

Méthodes histochimiques de révélation de l'activité ATPasique myofibrillaire dans le muscle strié squelettique

Méthode de Padykula Hermann.
» Wachstein Meisel.

» Maengwyn Davies.
» King Engel.

Conclusion.

Bibliographie.

INTRODUCTION

La musculature squelettique, siège des contractions volontaires, représente l'un des outils essentiels dans la vie de relations des êtres vivants. Le métabolisme cellulaire producteur d'énergie, au niveau de la fibre, est en relation directe avec la « machinerie contractile » permettant la dynamique musculaire.

Le facteur commun aux deux systèmes est représenté par les adénosines triphosphatases libérant l'énergie directement consommée en travail. Les propriétés de cette enzyme diffèrent suivant le type de fibre.

Il existe des fibres possédant un métabolisme aérobie où les adénosines triphosphatases ne sont que peu actives et celles ayant un métabolisme anaérobie où l'activité adénosine triphosphatase est intense.

Il nous est apparu utile d'essayer de préciser le rôle des ATPases (adénosines triphosphatases) dans la contraction musculaire.

Dans un premier chapitre, après un rappel de la morphologie musculaire, nous étudierons la biochimie des myofilaments et l'innervation motrice du muscle.

Après une étude du mécanisme de la contraction, nous décrirons les différentes voies produisant l'énergie nécessaire.

Puis, après un bref rappel de la différenciation des types de fibres musculaires, d'après leurs caractères morphologiques spécifiques, nous envisagerons le point de vue enzymatique, ce qui nous amène à décrire le rôle des ATPases tant au niveau du sarcoplasme, qu'au niveau des filaments.

La dernière partie de notre ouvrage sera consacrée aux méthodes expérimentales, permettant d'identifier les diffé-

rents types de fibres musculaires d'après leur équipement ATPasique, de l'emploi que nous avons pu en faire et des résultats.

MORPHOLOGIE MUSCULAIRE

BIOCHIMIE DES FILAMENTS

INNERVATION

MORPHOLOGIE MUSCULAIRE

Le tissu musculaire strié représente une fraction importante du poids de l'organisme (40 %). Une étude morphologique approfondie révèle des différences de coloration entre certains muscles; certains paraissent plus sombres, comme les muscles diaphragmatiques de toutes les espèces; d'autres sont plus clairs, comme le muscle pectoral du poulet. Nous verrons, plus tard, que ces variations tinctoriales correspondent à des types de fibres musculaires bien distincts tant au point de vue physiologique qu'au point de vue biochimique.

L'unité morphologique de ce tissu est la cellule musculaire ou fibre musculaire, exceptionnellement longue (atteignant 12 cm chez l'Homme), sa largeur varie suivant l'espèce, le sexe (elles sont plus fines chez la femelle), l'individu (régime alimentaire) et le muscle. Elle oscille entre 10 et 100 μ.

Les cellules musculaires ont l'aspect d'un cylindre ou d'un polyèdre à angles arrondis. Leur disposition peut se diviser en deux classes : les fibres peuvent être toutes parallèles dans un muscle (psoas : raccourcissement important) ou en oblique suivant une disposition penniforme (muscles allongés).

Les fibres musculaires se rassemblent pour former des faisceaux (primaire, secondaire, tertiaire). Les fibres musculaires, les faisceaux, le muscle lui-même sont entourés par du tissu conjonctif. Celui-ci forme un stroma continu et contient les vaisseaux sanguins, les nerfs et du tissu adipeux. Ce tissu d'emballage est désigné différemment suivant sa

localisation topographique : autour du muscle c'est l'épimysium, autour des faisceaux le périmysium, autour des vaisseaux l'endomysium; ainsi les fibres musculaires sont indépendantes les unes par rapport aux autres.

Deux propriétés histologiques caractérisent la fibre musculaire : c'est d'être plurinucléée et de contenir des éléments hautement différenciés : les myofibrilles.

C'est dès la formation embryonnaire que ces caractéristiques apparaissent.

Histogenèse

Dès la vie embryonnaire, les fibres musculaires prennent naissance à partir du mésoblaste ou du mésenchyme.

Le mésoblaste et le mésenchyme ont été formés à partir de somites situés au long de l'ébauche du névraxe. Les muscles formés aux dépens du mésoblaste (myotomes) sont ceux du tronc et de la nuque, les autres sont formés à partir du mésenchyme.

Au premier stade la cellule musculaire est mononucléée (myoblaste) puis, par la suite, le fusionnement des myoblastes et peut-être aussi la prolifération des noyaux sans division concomitante du cytoplasme, constituent la fibre musculaire plurinucléée de grande taille.

Les myofibrilles ne dérivent pas des mitochondries comme on l'a cru, mais de fins filaments d'abord situés à la périphérie de la cellule, les noyaux restant en position centrale. Par la suite, les myofibrilles biréfringentes migrent vers le centre de la fibre, tandis que les noyaux sont rejetés à proximité de la membrane cellulaire.

Structure

Comme toute cellule, la fibre musculaire est entourée par une membrane : le sarcolemme. La fibre musculaire est formée d'une masse cytoplasmique, le sarcoplasme, renfermant les enclaves cytoplasmiques habituelles, un système tubulaire particulier et les myofibrilles.

Afin de donner une meilleure homogénéité à notre exposé, il nous est apparu nécessaire de traiter la biochimie des myofibrilles aussitôt après avoir décrit leur morphologie.

Le sarcolemme

Le sarcolemme est une membrane fine, difficilement colorable. Le microscope électronique a permis de connaître sa structure. Nous distinguons, en fait, deux parties :

— l'une extérieure, granuleuse, de 500 à 1 000 A* d'épaisseur, composée de polysaccharides, constitue la « membrane basale » ;

— l'autre, de 70 A d'épaisseur, est nommée membrane plasmique.

Le sarcolemme suit les variations de la fibre musculaire au cours de la contraction sans se plisser, ni se déchirer, grâce à deux propriétés : d'une part, il est élastique et, d'autre part, il est relativement résistant.

La membrane plasmique joue un rôle important dans la contraction musculaire. Elle se polarise lors de l'excitation nerveuse. Cette membrane pénètre la fibre musculaire en certains endroits, formant des tubules appelés système T.

Les noyaux

Situés sous le sarcolemme, de forme ovoïde, allongés, parallèlement à la direction de la fibre, ils sont nombreux (en moyenne 30 à 40 par mm). Leurs dimensions sont de 5 à 10 μ environ. Dans les « muscles rouges », ils sont plus dispersés que dans les « muscles blancs ».

Les noyaux ont généralement un ou deux nucléoles, et la chromatine, modérément abondante, est située le long de la face interne de l'enveloppe nucléique.

Le sarcoplasme

Il s'identifie au cytoplasme des autres cellules. Il comprend une « matrice » renfermant des organelles, des inclusions et un pigment rouge respiratoire : la myoglobine. Les variations de la teneur de ce pigment dans les fibres musculaires expliquent les différences tinctoriales remarquées auparavant.

Les appareils de Golgi en rapport avec l'état de syncytium de la fibre musculaire sont multiples et petits, situés chacun près d'un pôle nucléaire.

Les mitochondries ou sarcosomes sont nombreuses, situées

* signifie Amström

au voisinage des noyaux. Elles se retrouvent en rangées entre les myofibrilles, surtout dans les muscles rouges. Des enclaves lipidiques sont en contact avec des mitochondries.

Le réticulum endoplasmique

Appelé ici réticulum sarcoplasmique, est très développé. Il est constitué de tubules se dirigeant principalement dans deux directions perpendiculaires; les uns courent parallèlement aux myofibrilles, les autres disposés transversalement ont des anastomoses latérales. L'ensemble forme un réseau autour de chaque myofibrille.

Le réticulum sarcoplasmique présente également des parties dilatées en forme de vessies (cisternae). Sa paroi est lisse, ne contenant pas de ribosomes. Nous étudierons plus loin son rôle dans la contraction musculaire.

Le système T

Ce système est constitué de tubules transverses localisés au niveau des stries Z. Ces tubules sont des invaginations de la membrane plasmique. Ces recherches ont été motivées par le fait que des marqueurs inertes pénétraient à l'intérieur de ces tubules.

Le microscope électronique a confirmé l'existence de la continuité membranaire.

Cette continuité a été souvent discutée, ceci étant dû au fait que sur les nombreuses observations effectuées au microscope électronique, très peu de tubules s'ouvraient à l'extérieur de la fibre musculaire striée, mais le plus souvent s'arrêtaient au voisinage du sarcolemme. C'est ainsi que pour E.B. Sandborn l'ouverture du système T dans le milieu extérieur n'était que momentané.

Ce système T est bordé par le réticulum sarcoplasmique des deux sarcomères voisins. Ces trois éléments, c'est-à-dire les deux éléments du réticulum sarcoplasmique et le tubule transverse, constituent une triade. Le tubule transverse est séparé du réticulum sarcoplasmique par un espace de 100 A environ et ne possède aucune liaison avec celui-ci.

Le système T constitue un élément de liaison entre le milieu extérieur et les myofibrilles. C'est grâce à la connaissance du fonctionnement de cette triade que les mécanismes

fondamentaux de la physiologie musculaire ont pu être connus.

Les myofibrilles

Sont des structures protoplasmiques hétérogènes et biréfringentes. Elles sont cylindriques et leur diamètre varie entre 1 et 2 μ.

Elles sont disposées longitudinalement et leur longueur égale celle de la fibre. Leur nombre est plus important dans le muscle blanc que dans le muscle rouge ($10^8/cm^2$ de muscle en moyenne chez l'Homme).

La biréfringence, en contraste de phase et en lumière polarisée, est due à l'alternance de disques clairs et de disques sombres.

Les disques clairs ou isotropes (I) et les disques sombres (ou anisotropes) (A) sont respectivement placés au même niveau pour toutes les myofibrilles. La double striation de la fibre musculaire s'explique ainsi : longitudinalement elle est due à l'existence des myofibrilles et transversalement à la disposition particulière des disques A et I.

Les disques isotropes sont divisés transversalement en leur milieu par un télophragme (Policard) nommé aussi strie Z (Zwischensheibe) qui est une membrane très fine. Il a été défini que l'unité fondamentale ou sarcomère des myofibrilles est l'espace situé entre deux stries Z.

Les disques anisotropes sont partagés transversalement en leur milieu par une bande plus claire, la bande de Hensen (bande H), parfois mal délimitée. On observe également, mais assez rarement, une membrane très mince, la strie M (Mittelscheibe) qui divise transversalement et en son milieu la bande H.

Dans le muscle relâché des Mammifères, le disque A a une hauteur de 1,5 μ et le disque I de 0,8 μ.

L'étude des myofibrilles au microscope électronique a permis de connaître leur structure. C'est grâce aux travaux de Huxley que l'on a découvert l'existence de filaments submicroscopiques de nature protéique : les myofilaments longitudinaux.

Ces myofilaments sont de deux types : les uns épais

constitués de myosine, situés au niveau des disques A, de 100 A de diamètre et de 1,5 μ de longueur; les autres composés d'actine, encore appelés les filaments fins, sont présents dans les disques I et A, mais absents de la bande H, d'un diamètre de 50 A et de 2 μ de longueur.

Les myofilaments présentent dans la fibre une disposition paracristalline. Dans le disque I les filaments d'actine sont en hexagones réguliers, dans le disque A les filaments de myosine sont entourés de six filaments fins et un filament d'actine, de trois de myosine; dans la bande H les filaments épais sont disposés en losange (J.R. Bendall).

Les deux types de myofilaments sont réunis par des ponts transversaux qui semblent jouer un rôle important dans la contraction musculaire. Ces ponts vont des gros filaments vers les filaments d'actine avoisinants. Ils sont séparés de 60 à 70 A, on parle de site actif au niveau de la jonction du pont transversal à l'actine. Ces ponts forment une hélice de symétrie 6 de 400 A de long (Huxley).

Les filaments d'actine se terminent au niveau de la strie Z par quatre fins filaments divergents appelés Z filaments. Chacun de ceux-ci fuient obliquement à travers la strie Z vers un filament mince, situé de l'autre côté. Ces filaments Z font apparaître un zig-zag caractéristique au niveau de la strie Z.

Les myofilaments sont constitués de trois protéines essentielles : l'actine, la myosine et la tropomyosine.

— *L'actine.*

Découverte par Straub, en 1942, elle représente environ 25 % du poids sec des myofibrilles. Cette protéine existe sous deux formes : une forme globuleuse, l'actine G, et une forme fibreuse ou actine F. L'actine G, de poids moléculaire avoisinant 60 000, mesure approximativement 290 A de longueur et 24 A de diamètre. Elle représente la forme monomère de l'actine F. Chaque molécule d'actine G est liée à une molécule d'ATP. La polymérisation de l'actine G est obtenue en présence d'ions monovalents (Na^+, K^+) ou bivalents, Mg^{2+} ou Ca^{2+}, si celui-ci agit seul. L'énergie nécessaire à la réaction provient de l'hydrolyse de l'ATP lié à l'actine G. La molécule d'ATP est clivée et donne de l'ADP et du phosphate inorganique.

L'actine F, fibreuse, a un diamètre de 80 A et un poids moléculaire de plusieurs millions.

La polymérisation de l'actine G n'est pas régie par une activité ATPasique: une quantité donnée de la protéine peut déphosphoryler une quantité illimitée d'ATP (Gergely).

— *La myosine.*

Isolée en 1864 par Kühne, c'est la protéine structurale la plus (importante) abondante du muscle strié (55-60 %).

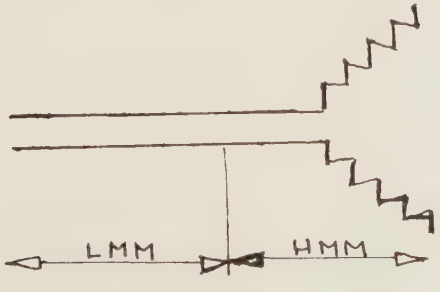
Un filament de myosine contiendrait 25 à 30 molécules de myosine dans sa section transversale. Le poids moléculaire de celle-ci avoisine 450 000. C'est une protéine qui est précipitée par une faible force ionique. Les molécules sont très longues (1 700 A) et de 30 A d'épaisseur. Elles possèdent comme propriétés fondamentales : une activité enzymatique ATPasique et le pouvoir de se lier avec l'actine.

Par hydrolyse trypsique ménagée, il est possible de scinder la molécule de myosine en deux fragments nommés méromyosine.

L'un des fragments de poids moléculaire de 120 000 est appelé la L.M.M. (light meromyosin) ou fragment léger; c'est une tige de 900 A de longueur et de 20 A d'épaisseur dont les 4/5es environ sont constitués d'une chaîne polypeptidique en hélice.

L'autre fragment, de poids moléculaire voisin de 320 000, est appelé la H.M.M. (heavy meromyosin) ou fragment lourd. Il mesure approximativement 800 A de long et 30 A d'épaisseur. Ce fragment supporte, à lui seul, l'activité enzymatique et le pouvoir de se lier à l'actine.

Gergely représente ainsi une molécule de myosine :



La molécule de myosine correspond schématiquement à

une canne avec une longue partie rigide et une tête globuleuse. La partie rigide constituée de L.M.M. formerait le corps des myofilaments et la partie globuleuse constituée de H.M.M. est projetée latéralement.

C'est au niveau des têtes globuleuses que sont observés les ponts transversaux unissant la myosine à un site actif de l'actine.

Les molécules de myosine dans les myofilaments sont disposées de la façon suivante : la tête globuleuse de l'une est adjacente à l'extrémité d'une queue rigide. Au niveau de la bande H n'est présente aucune tête globuleuse.

— *Tropomyosine*.

Cette protéine a été découverte récemment après l'actine et la myosine (Bailey, 1946). Ses propriétés sont moins bien connues que celles de ces dernières.

Elle constitue 5-15 % des protéines structurales du muscle squelettique. Le poids moléculaire de son monomère est de 53 000, il mesure 400 A de long et 15 A d'épaisseur.

Cette molécule est donc très allongée et l'examen des diagrammes de diffraction des rayons X indiquent une structure hélicoïdale α rappelant celle de la myosine légère. Les macromolécules de tropomyosine forment des plaquettes à forte teneur en eau (80-90 %) et ont tendance à se grouper en réseaux tridimensionnels formant ainsi les « cristaux » observés au microscope électronique.

La tropomyosine est très résistante aux dénaturants chimiques. Aucun groupement aminé terminal n'ayant été décelé, on en déduit qu'elle est constituée de chaînes polypeptidiques cycliques (Tsao).

La tropomyosine partage avec les autres protéines musculaires la possibilité de se lier avec différents composés comme l'acide nucléique, l'actine. Elle possède également une grande affinité calcique.

Elle ne possède pas de propriétés contractiles bien définies. La tropomyosine paraît être localisée au niveau de la strie Z (Huxley) sous sa forme cristallisée, mais ne serait pas le composant unique de cette strie. Elle est, également, présente au niveau du disque I, sous une autre forme, liée à l'actine.

L'INNERVATION MOTRICE DU MUSCLE

Elle est le point de départ de la contraction musculaire. Un muscle dinnervé est voué à la dégénérescence. Les nerfs moteurs destinés aux muscles passent par les cornes antérieures de la moelle épinière, et font partie du groupe des A_α neurones. Adrian a créé le terme d'unité motrice pour désigner l'ensemble fonctionnel : axone - fibres musculaires innervées par celui-ci.

La jonction nerf-muscle est une synapse très particulière puisqu'elle assure le contact entre deux structures différentes, elle a reçu le nom de plaque motrice ou synapse neuro-musculaire.

Les plaques motrices sont localisées à la surface de la fibre musculaire et situées, le plus souvent, vers le milieu de sa longueur. Au niveau de la synapse se trouve un amas de cytoplasme encore appelé sole de Kühne, qui renferme des noyaux ovoïdes et de nombreuses mitochondries. A ce point, le neurone se ramifie, ce qui constitue l'arborisation terminale.

La composante musculaire de la synapse est séparée de la plaque motrice du nerf par sa membrane plasmique. L'intervalle entre les deux membranes est de 500 A. Un grand nombre de vésicules contenant de l'acétylcholine sont renfermées dans l'arborisation terminale du nerf. C'est également à ce niveau que l'acétylcholinestérase fut découverte par Couteaux et Coers.

La membrane musculaire plasmique au niveau de la plaque motrice apparaît plus dense que celle de la composante nerveuse. En plus, la surface de la fibre musculaire à ce niveau est creusée par des invaginations membraneuses qui s'étendent profondément à l'intérieur du sarcoplasme. La densification plus forte de la face interne de la membrane musculaire se prolonge jusqu'à une certaine distance à l'intérieur de ces invaginations. Autour de ces invaginations, on retrouve un réseau de micro-tubules du réticulum sarcoplasmique.

Transmission de l'influx nerveux

L'influx nerveux libère l'acétylcholine, qui joue le rôle du médiateur chimique. A son contact, la membrane muscu-

laire se dépolarise. L'acétylcholine serait produite par l'activité enzymatique des mitochondries situées dans le bouton synaptique. Puis, l'acétylcholine est détruite par l'acétylcholinestérase, dont l'intervention est liée aux fonctionnements du système T et du réticulum sarcoplasmique.

Les vésicules de l'arborisation terminale du nerf contenant de l'acétylcholine fixent des ions calciques venant du milieu extérieur. Lors de la dépolarisation de la membrane musculaire, les échanges d'ions monovalents (Na et K) seront accompagnés d'un flux calcique. Ce calcium semble jouer le rôle d'une recharge calcique de la fibre musculaire. Le magnésium serait un antagoniste du calcium à ce niveau.

MÉCANISME DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE

Avant de traiter le mécanisme de la contraction musculaire, il est nécessaire de rappeler ce que l'on observe au microscope au cours de ce phénomène.

Les observations faites sur un muscle en contraction montrent le raccourcissement du disque I et de la bande H. Le disque A conserve sa longueur. En cas de contraction extrême, les stries Z peuvent avoisiner le disque A et il n'existe plus de bande H. A l'aide du microscope électronique, des investigations plus précises ont révélé que les filaments d'actine et de myosine sont distincts, que leur longueur ne variait pas au cours de la contraction, mais, seulement, leur position relative.

Ce sont les travaux de Gordon, Huxley et Julian qui dévoilèrent les différents degrés d'imbrication des myofilaments.

Ces constatations amenèrent Huxley à établir la théorie du glissement.

Le degré d'imbrication est en rapport avec le nombre de ponts transversaux reliant la myosine à l'actine.

A l'heure actuelle, c'est cette théorie qui est la plus communément admise.

Le déplacement des myofilaments correspond à un mécanisme moléculaire que nous allons étudier.

Mécanisme moléculaire

Si on effectue un mélange convenable d'actine et de myosine, on obtient un complexe d'actomyosine provoquant une augmentation considérable de la viscosité du mélange.

Le rapport de combinaison entre l'actine et la myosine serait de 1 pour 1 (il serait de 1 pour 4 pour Gergely).

L'actomyosine se contracte, in vitro, en présence de Mg^{2+}, Ca^{2+} et ATP (Malmejal).

Un processus particulier obtenu expérimentalement depuis peu pourrait représenter, assez exactement, le mécanisme moléculaire de la contraction : ce processus est celui de la superprécipitation. Ce phénomène consiste en une agglomération des deux types de filaments musculaires, ceux-ci conservant leurs formes et leurs dimensions. Il se traduit par une attraction interfilamentaire. Pour l'obtention de cette superprécipitation trois éléments sont nécessaires : de l'acide adénosine triphosphorique, des ions Mg^{2+} et Ca^{2+}. Les ions Ca^{2+} qui provoquent l'agglomération des filaments ont cependant un rôle indirect.

Les ions Mg^{2+} interviennent pour dissocier les complexes d'actomyosine et semblent jouer le rôle primordial. En effet, la description de quelques expériences effectuées par Pinset, Harström et Martineau, vont nous préciser le rôle de ces deux cathions :

— pour que le phénomène de superprécipitation puisse avoir lieu il faut que les filaments soient dissociés, pour cela il faut une concentration des ions $Mg^{2+} \geqslant 6\ 10^{-7}$ M;

— pour que les filaments de myosine se forment, il faut une concentration de $Mg^{2+} \geqslant 2\ 10^{-7}$ M;

— la superprécipitation se produit dès l'adjonction d'ATP en l'absence de Ca^{2+}, si la concentration de $Mg^{2+} \leqslant 3{,}7\ 10^{-6}$ M.

L'actomyosine doit être préalablement mise au contact de l'ATP et de Mg^{2+} pour réagir à l'adjonction de Ca^{2+} et donner cette synérèse qui s'accompagne, comme lors de la contraction musculaire, d'une augmentation de l'activité ATPasique de la myosine.

Les ions Mg^{2+} agiraient en des sites distincts, les ions Ca^{2+} produiraient la superprécipitation en déplaçant les ions Mg^{2+} du site inhibiteur. Ce phénomène de superprécipitation est réversible.

Grâce à ces constatations, on peut expliquer la contraction musculaire ainsi :

Le glissement des myofilaments entre eux entraîne une réduction de longueur du muscle. Ce mouvement dépend des ponts transversaux reliant la myosine à un site actif

de l'actine. Ces ponts, après rupture, vont se fixer au site actinique voisin ou même à un site actinique plus éloigné, obtenant ainsi un raccourcissement plus important du muscle. L'imbrication des filaments se fait donc par un mécanisme à « cliquets ». Ceci représente l'effet de la contraction musculaire. L'hypothèse suivante va, quant à elle, permettre de décomposer le processus en sa totalité.

Au repos, le mécanisme moléculaire est bloqué par un inhibiteur de l'activité ATPasique de la myosine, le facteur de Marsh-Bendall. Ce facteur, d'un poids moléculaire voisin de 10 000, s'intensifie probablement à la myokinase. Les ions Mg^{2+} constituent pour ce facteur un effecteur positif et les ions Ca^{2+} un effecteur négatif.

Nous pouvons donc, dans ces conditions, expliquer ainsi le déclenchement de l'activité du système contractile.

Dans le muscle au repos, les ions Mg^{2+} sont associés au facteur de Marsh-Bendall et bloquent l'activité ATPasique de la myosine. Lors du passage de l'influx nerveux, il se produit une dépolarisation génératrice d'ions Ca^{2+} qui déplacent les ions Mg^{2+}, le facteur de Marsh-Bendall se trouve ainsi inhibé, l'activité enzymatique de la myosine peut s'exercer. Il y a hydrolyse de l'ATP, polymérisation de l'actine G en actine F, activation de l'actine qui aboutit à la contraction musculaire. La contraction terminée, les ions Ca^{2+} sont repris par des granules possédant une activité enzymatique, les ions Mg^{2+} retrouvent leur place et le muscle revient en état de repos.

SOURCE D'ÉNERGIE

DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE

La contraction musculaire puise son énergie, principalement, dans la dégradation anaérobie ou aérobie du glucose.

Cette énergie ne peut pas être employée directement par le système myofilamentaire. Un processus intermédiaire est obligatoire, son action est rapide, mais limitée. Ses facteurs sont l'acide adénosine triphosphorique et le phosphagène ou phosphorylcréatine.

Les réactions se font suivant le type :

$$\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{ATPase}]{} \text{ADP} + \text{phosphate inorganique} + \text{énergie}$$

$$\text{Phosphagène} \longrightarrow \text{créatine} + \text{phosphate inorganique} + \text{énergie}$$

Les phosphagènes sont, quantitativement, plus nombreux dans les muscles squelettiques que partout ailleurs. Leur taux diminue quand le muscle travaille. Mais Lohmann (cité par Kayser) montra qu'il n'existe pas d'enzyme capable d'hydrolyser directement le phosphagène. Il faut donc écrire les réactions ainsi :

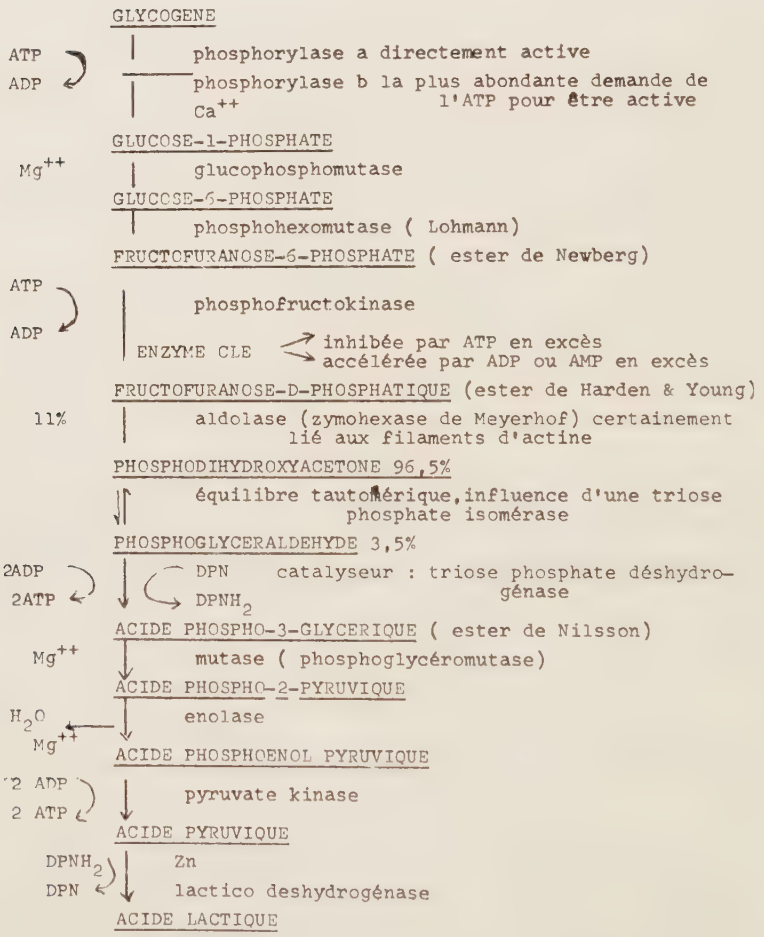
$$\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{ATPase}]{} \text{ADP} + \text{phosphate inorganique} + \text{énergie}$$

$$\text{Phosphagène} + \text{ADP} \xrightarrow[\text{créatine-phosphory-transférase}]{} \text{créatine} + \text{ATP}$$

C'est donc l'ATP qui fournit exclusivement, lors de son hydrolyse, l'énergie à la myofibrille. Le phosphagène apporte, quant à lui, les radicaux phosphoryls à liaison énergétique.

L'ATP n'est pas synthétisé au sein de la fibre, on constate

que l'ATP et l'ADP marqués pénètrent à l'intérieur de la fibre musculaire, à l'inverse l'adénosine marqué ne la pénètre pas. Il est à noter que l'ATP est l'antagoniste du glucose lors de la pénétration cellulaire. Il est bien certain que ces apports d'ATP ou d'ADP en nature ne représentent qu'une très faible quantité comparés aux apports de glucose.



Voie d'Embden Meyerhof
Glycogénolyse anaérobie.

Elle sert à régénérer l'ATP et le phosphagène de la fibre musculaire.

— *Glycolyse anaérobie.*

Elle siège à l'extérieur des mitochondries et produit de l'acide pyruvique et de l'acide lactique (le cycle de Krebs ne peut pas être emprunté puisqu'il demande l'oxygène). Quand le muscle produit un effort important une évacuation sanguine de l'acide lactique en excès est observée. Le foie se servira de cet acide pour régénérer du glycogène, mais une partie de l'acide lactique gagnera le système rénal et une légère lactosurie se produira.

Cette glycolyse anaérobie ou voie d'Embden-Meyerhof est freinée, en cas d'excès d'ATP, au niveau du fructofuranose 6-phosphate ou ester de Newberg, la phosphofructokinase étant inhibée.

Au contraire, l'ADP et l'AMP l'accélèrent, en activant la phosphorylase b et la phosphofructokinase (cf. tableau).

De même, les ions K^+ conduisent à l'épuisement du glycogène, tandis que les ions Na^+ favorisent sa synthèse.

Une étape essentielle de la glycolyse anaérobie est celle du passage de l'acide phospho-glycéraldéhyde en acide phospho-3-glycérique. Cette réaction est liée à un phénomène de phosphorylation. Lors d'une réaction intermédiaire, l'aldéhyde est transformée en acide diphospho-1-3-glycérique.

Il faut donc un acide phosphorique libre fourni par l'hydrolyse de l'ATP (présence obligatoire d'adénosine triphosphatase). Cette réaction permet successivement de réduire le nicotinamide adénine diphosphate (NAD), de phosphoryler un ADP en ATP, de produire de l'acide phospho-3-glycérique.

En bilan, on peut considérer que cette voie ne produit que peu d'énergie. En effet, pour une molécule de glucose dégradée, nous obtenons 4 molécules d'ATP auxquelles il faut soustraire 2 molécules qui sont consommées au cours des différentes étapes (phosphorylation du glycogène et du fructofuranose 6-phosphate). En contrepartie, elle permet au muscle de travailler en l'absence d'oxygène lors de travail intense.

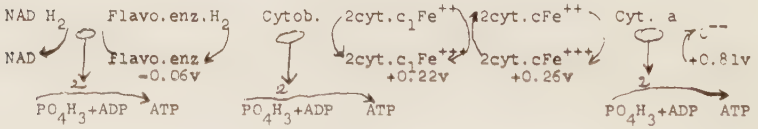
L'anoxie augmente la vitesse de la glycolyse (effet Pasteur). En anaérobiose, la synthèse d'ATP s'élève et il y a inhibition de la phosphofructokinase. Inversement, quand la cellule est en présence d'une forte concentration de glucose, le taux des oxydo-réductions diminue (effet Crabtree).

— *La glycogénolyse aérobie.*

La dégradation du glycogène s'effectue jusqu'à l'acide pyruvique comme précédemment, mais là, l'acide entre dans un cycle d'oxydo-réductions (cycle tricarboxylique, cycle citrique ou cycle de Krebs).

Les mitochondries sont le siège de ces réactions. Green a observé que les membranes mitochondriales supportaient des particules élémentaires polyédriques de 85 à 125 A de diamètre, l'équipement enzymatique complet de la phosphorylation oxydative (cyclophorase).

Le bilan du cycle est l'oxydation complète du radical acétyl. Le facteur oxydant est le NAD. Le NAD-H_2 doit être oxydé à son tour pour être à nouveau actif. Cette action exige l'intervention d'une chaîne oxydative mitochondriale (Polonowski).



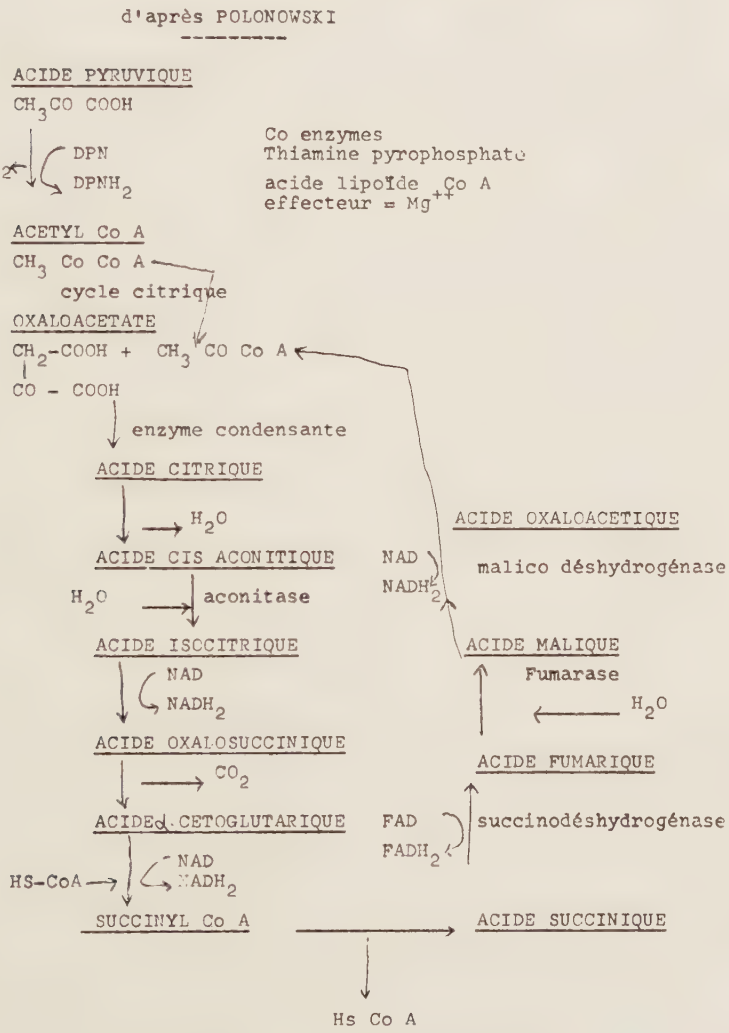
D'autre part, Eisenhardt (R.H.) et Rosenthal (O.) ont effectué des travaux qui ont révélé l'existence d'intermédiaires au niveau de cette chaîne respiratoire. Ces intermédiaires sont le β-hydroxybutyrate et le succinate. Ceux-ci apporteraient des liaisons énergétiques permettant une formation accrue et plus rapide des ATP.

L'approvisionnement de l'oxygène, dans les muscles, ne limite pas l'activité des chaînes respiratoires de ces muscles pendant la contraction. Toutefois, les lactates s'accumulent lors de grande activité musculaire du fait que la glycolyse anaérobie s'effectue plus rapidement que l'utilisation des pyruvates par la voie du cycle tricarboxylique, sans que l'anoxie soit en cause (Jöbsis et Stainsby).

C'est la raison pour laquelle le sang évacue cet excès et que l'on observe parfois une lactosurie.

Le bilan de la glycolyse aérobie pour une molécule gramme de glucose (180 g) est de 38 molécules d'ATP produites; elles représentent un peu moins des 2/3 de l'énergie, le reste

Schéma du cycle citrique



étant dissipé en chaleur. La voie aérobie est donc la voie énergétique la plus « économique », mais la plus lente.

Oxydation des acides gras

Les enclaves lipidiques situées près des mitochondries fournissent certainement les acides gras qui s'introduisent dans le cycle de Krebs, sous forme d'acétyle coenzyme A, après un cycle de dégradation. Ces acides gras non estérifiés constituent d'après Kayser une source d'énergie pour les muscles squelettiques en état stationnaire.

LES DIFFÉRENTS TYPES DE FIBRES MUSCULAIRES

Ainsi que nous l'avons indiqué auparavant, on distingue principalement deux types de fibres musculaires : un type rouge et un type blanc; cependant, cette division est nuancée par l'existence d'un type intermédiaire de fibres musculaires possédant des caractères communs aux types précédents.

Le déterminisme génétique des fibres musculaires semble dépendre d'un rôle trophique appartenant aux neurones. En effet, si on pratique expérimentalement une innervation croisée, c'est-à-dire un neurone innervant une fibre de type rouge est greffé sur une fibre de type blanc, on constate que cette fibre de type blanc se transforme en type rouge (la réciproque étant vraie) (Guth, Samaha, Albers).

La répartition des types de fibres musculaires est éminemment variable. Nous pouvons citer les travaux de Perot basés sur l'étude des muscles lombaires de la masse commune chez les bovidés, qui mentionnent les proportions suivantes :

fibres de type blanc	67,5 %
fibres de type rouge	32,5 %

Nous avons pu établir les proportions suivantes à partir de coupes faites sur des muscles jumeaux de bovins, ces résultats sont approximatifs :

Chef interne :

fibres type rouge	5 %
fibres type blanc	75 %
fibres type intermédiaire	19 %

Chef externe :

fibres type rouge	7,5 %
fibres type blanc	75 %
fibres type intermédiaire	17,5 %

Par contre, le diaphragme ne renferme pour ainsi dire que des fibres de type rouge.

Le diamètre des fibres diffère suivant leur type, toutefois il n'est pas possible de retenir ce critère comme moyen d'identification des fibres. En effet, il dépend de l'espèce, de la race, du sexe et des muscles eux-mêmes (Padykula, Gauthier).

Perot, dans ses travaux sur les muscles de la masse commune des Bovidés, cite les mensurations suivantes :

— les fibres rouges ont un diamètre de 50 à 60 μ en moyenne;

— les fibres blanches ayant un diamètre de 80 à 90 μ en moyenne.

Voici d'autres exemples tirés des travaux de Dubowitz :

— pour le Rat :

gastrocnemien :		
fibres blanches.	50-60 μ	de diamètre
fibres rouges.	25-50 μ	»
oblique externe :		
fibres blanches.	50-70 μ	»
fibres rouges.	20-40 μ	»

— pour le Pigeon :

pectoral :		
fibres blanches.	40-50 μ	»
fibres rouges.	20-35 μ	»
gastrocnemien :		
fibres blanches.	50 μ	»
fibres intermédiaires.	25-30 μ	»
fibres rouges.	25-30 μ	»

Nous avons pu effectuer également des mensurations, grâce à notre méthode dont la technique sera détaillée dans notre dernier chapitre. Nos travaux intéressent les muscles jumeaux (chef externe) chez les Bovidés, et nous trouvons en première approximation les diamètres suivants :

fibres blanches.	42-51 μ
fibres rouges.	28-35 μ

On peut conclure que les fibres rouges sont plus fines que les fibres blanches à l'intérieur d'un même muscle.

D'autres caractères différencient les types de fibres musculaires, certains concernent le sarcoplasme indifférencié et d'autres les mitochondries.

Les fibres de type rouge sont riches en sarcoplasme indifférencié; celui-ci renfermant la myoglobine, ce qui explique la coloration de ces fibres, tandis que les fibres de type blanc sont pauvres en sarcoplasme indifférencié.

L'abondance du sarcoplasme dans les fibres de type rouge s'accompagne d'un équipement mitochondrial important. Les mitochondries sont grandes, sphériques et nombreuses, situées directement sous la membrane cellulaire ou en position inter-myofibrillaire, formant ainsi de longues chaînes. Elles sont entourées de nombreuses gouttelettes lipidiques.

Par contre, les mitochondries des fibres blanches sont petites, rares, situées sous la membrane ou en position inter-myofibrillaire; elles sont pratiquement toutes au niveau du disque I. Les fibres de type intermédiaire possèdent de petites mais nombreuses mitochondries.

On a également constaté que pour une excitation donnée la vitesse de réponse de la fibre variait suivant son type. Les fibres rouges semblent être, en moyenne, plus lentes que les fibres blanches. Les muscles en majorité du type rouge ont reçu le nom de muscles lents ou toniques; les muscles en majorité du type blanc, celui de muscles rapides ou phasiques (Gutmann). Ce critère est pratiquement abandonné de nos jours.

En bilan, on peut dire que tous ces facteurs de différenciation sont trop variables pour permettre l'élaboration d'une technique permettant la reconnaissance des fibres musculaires.

Les distinctions, à l'heure actuelle, portent surtout sur les variations des activités enzymatiques des différents types (Helen, Padykula, F. Gauthier, Guth, Samaha).

DIFFÉRENCES ENZYMATIQUES

La fibre de type rouge possède une puissante activité enzymatique vis-à-vis du métabolisme oxydatif. Sa richesse en mitochondries en témoigne. Au contraire, la fibre de type blanc possède une activité enzymatique extra-mitochondriale

très importante, c'est donc le métabolisme glycolytique qui sera élevé et sa réserve en adénosine triphosphate sera supérieure à celle de la fibre de type rouge.

Ceci explique, en partie, la possibilité que possède la fibre de type blanc de répondre rapidement et de maintenir assez longtemps sa contraction lors d'une excitation.

L'activité protéolytique et le taux d'incorporation des acides aminés suivent les mêmes variations et sont plus élevés dans les fibres de type rouge, ce qui laisse penser que celles-ci posséderaient un « turn over » protéique plus important. Cela révèle une usure des myofilaments due à une tension maintenue plus longtemps (Gutmann).

L'activité enzymatique de choix pour différencier les fibres musculaires d'après leur vitesse de contraction est celle des adénosines triphosphatases. Dans les fibres de type blanc, l'ATPase stable au pH alcalin est détruite au pH acide. Cette ATPase est beaucoup plus active (3 à 4 fois) que celle du type rouge (Samaha, Guth, Albers, Yellin).

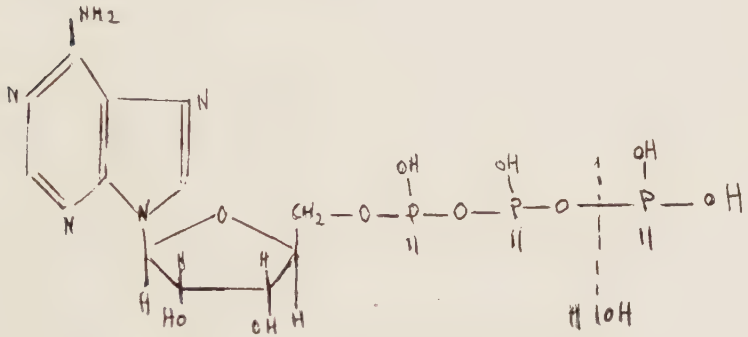
Dans les fibres de type rouge, l'ATPase stable au pH acide et labile au pH alcalin, est beaucoup plus fragile.

Dans les fibres du type intermédiaire, le pH de stabilité est situé entre ceux des deux autres types. Cette activité ATPasique est réglée par l'innervation qui interviendrait sur les protéines constituant le support enzymatique.

ROLE DES ADENOSINES TRIPHOSPHATASES

Les ATPases hydrolysent l'ATP en produisant de l'ADP, de l'acide orthophosphorique plus de l'énergie.

Voici le schéma de la réaction :



acide adénosine triphosphatique

Les ATPases dans la fibre musculaire peuvent être séparées en deux classes : celles appartenant aux protéines des myofibrilles (80 %) et celles situées dans le sarcoplasme (20 %).

Les ATPases myofibrillaires constituent le chaînon permettant de passer des phénomènes métaboliques aux phénomènes mécaniques présents dans la fibre musculaire. Les ATPases de la fibre musculaire sont à la base de la contraction musculaire et jouent un rôle dans sa régulation en intervenant sur les échanges calciques.

Les ATPases du sarcoplasme

— *Du réticulum sarcoplasmique.*

Les ATPases ont été localisées en se servant d'ATP marqué (^{14}C ou ^{32}P). Elles se situent dans la membrane du

réticulum sarcoplasmique. Nous savons que celui-ci était formé de tubules terminés par des vessies (cisternae) au niveau des stries Z de chaque sarcomère. Ces vessies forment des anneaux bordant une invagination membranaire appelée système T. Les ATPases se trouvent dans la membrane du réticulum sarcoplasmique au niveau des jonctions tubules-vessies. Leur rôle est de fournir l'énergie nécessaire au transport actif du calcium. YAMAMOTO et TONOMURA ont montré la formation d'un acide calcique phosphorylé stable, intermédiaire. La formation de cet acide nécessite l'hydrolyse de l'ATP en ADP.

Le calcium de la cellule musculaire est mis en réserve dans le réticulum sarcoplasmique au niveau des vessies (cisternae). Les réserves calciques sont plus importantes dans la fibre musculaire de type blanc, il provient du milieu extérieur et peut-être de la tropomyosine.

Les fibres musculaires de type blanc possèdent une activité ATPasique élevée et celle-ci est stimulée en présence de calcium.

On constate, en effet, que l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP est supérieure en présence de calcium dans la fibre de type blanc alors que le calcium n'a que peu d'effet sur l'activité ATPasique de la cellule de type rouge.

Les ATPases du réticulum sarcoplasmique seront activées lors du passage de l'influx nerveux, les invaginations membranaires au niveau de la strie Z avoisinent le réticulum, elles sont dépolarisées. Cette dépolarisation est donc transmise au réticulum sarcoplasmique, ce qui a pour effet d'activer les ATPases. Il y a alors libération du calcium vers les myofibrilles et la contraction est observée. Lors de la cessation de l'excitation le calcium sera repris, ce pompage du calcium par le réticulum sarcoplasmique ne s'effectue qu'en présence d'ATP ou de système de régénération d'ATP et s'accompagne d'une inhibition de l'activité ATPasique des myofibrilles et de la dissociation de l'actomyosine.

Ce sont des granules du réticulum sarcoplasmique qui sont responsables de ce « pompage » du calcium. Ces granules possèdent une activité ATPasique et un « facteur de relâchement » musculaire; l'existence de ce facteur est encore discutée.

Nous étudierons le rôle de l'activité ATPasique dans la relaxation musculaire après avoir décrit la contraction musculaire.

— *Des mitochondries.*

L'ATPase mitochondriale est située au niveau des membranes (Grossman, Heitkman). Son rôle est surtout important dans les fibres du type rouge. En particulier, elle détermine l'accumulation calcique au niveau des mitochondries. Aussi pense-t-on à un rôle certain dans la contraction musculaire. Néanmoins, le réticulum sarcoplasmique ne joue pas un rôle de réserves calciques aussi important que dans les fibres du type blanc. D'autre part, les ATPases mitochondriales sont responsables de la réaction réversible ATP $\rightleftarrows$ ADP durant le temps de la phosphorylation oxydative (Hardy et Wellman). Ainsi l'activité ATPasique, en hydrolysant l'ATP, fournit à la cellule les éléments nécessaires à l'oxydation. Celle-ci permettra la resynthèse d'ATP.

Les ATPases qui décomposent l'ATP et les kinases, qui portent l'acide orthophosphorique de l'ATP sur un substrat à activer, sont des activateurs de la respiration cellulaire. Cette dernière, par son effet, produit la régénération de l'ATP nécessaire au fonctionnement de la fibre musculaire vivante.

Les réserves calciques mitochondriales sont favorisées par la présence d'ions K^+, Na^+, d'ATP ou d'oxalates.

La constitution de ces réserves nécessite la présence des phosphates inorganiques et des ions Mg^{++}.

Par fractionnement, en présence d'un mélange d'ammonium sulfate et de sels biliaires on a obtenu des fragments mitochondriaux porteurs de l'activité ATPasique. Ces fragments comportent deux fractions : l'une protéinique, sans activité enzymatique; l'autre, soluble, sensible au froid, portant l'activité initiale.

Des travaux sur la partie porteuse de l'activité ATPasique ont révélé des subunités F_1 capables de restaurer l'activité ATPasique, mais ne la possédant pas en propre.

Il nous reste à étudier le dernier groupe d'ATPases.

Les ATPases myofibrillaires

Ce sont les travaux d'Huxley qui permirent de localiser exactement le siège de l'activité ATPasique des myofibrilles. On a révélé l'activité ATPasique au niveau des filaments de myosine dans le disque A. C'est la fraction lourde de la myosine (HMM) qui est le support et plus précisément les ponts transversaux. Nous avons vu auparavant que l'hydrolyse d'un ATP provoque la polymérisation de l'actine G en actine F et la formation du complexe d'actomyosine.

Lors de la contraction musculaire, il n'y a pas de compression moléculaire, mais une modification de position des filaments entre eux. Les ponts transversaux sont rigides et lors de contraction, on note une variation d'angles dans les associations d'attaches. Les ATPases, en apportant de l'énergie, permettent aux ponts transversaux ces liaisons nouvelles avec des sites actiniques actifs. L'activité ATPasique pour être stimulée demande un flux calcique.

Il existe deux activités ATPasiques de la myosine bien distinctes.

L'une, au repos, est inhibée par les ions Mg^{2++} et activée par les ions Ca^{2+}. L'autre, pendant l'activité, est très sensible à l'activation des ions Mg^{2+} et peu sensible à celle des ions Ca^{2+}. Ce serait l'actine qui, en se liant à la myosine, provoquerait la transformation de sensibilité de l'activité ATPasique. Pour Fuchs et Briggs, le complexe actomyosinique ne posséderait pas d'affinité calcique propre, mais que son affinité calcique serait due à la présence de tropomyosine liée à l'actine, en plus, cette tropomyosine fournirait du calcium nécessaire à l'activité ATPasique de la myosine. Mais nous savons que les études de la tropomyosine demeurent encore imprécises et ses résultats ne peuvent servir que d'hypothèse.

L'activité ATPasique pendant la contraction musculaire fournit continuellement de l'énergie aux myofibrilles, en effet, si on lave la fibre musculaire de son ATP, elle semble rester figée dans son état.

Il nous faut maintenant expliquer comment le mécanisme de la contraction musculaire, une fois active, cesse sans que la fibre musculaire ait besoin pour autant de « consommer » tout son ATP. Ce mécanisme de mise au repos du muscle est le phénomène de relaxation.

PHÉNOMÈNE DE RELAXATION

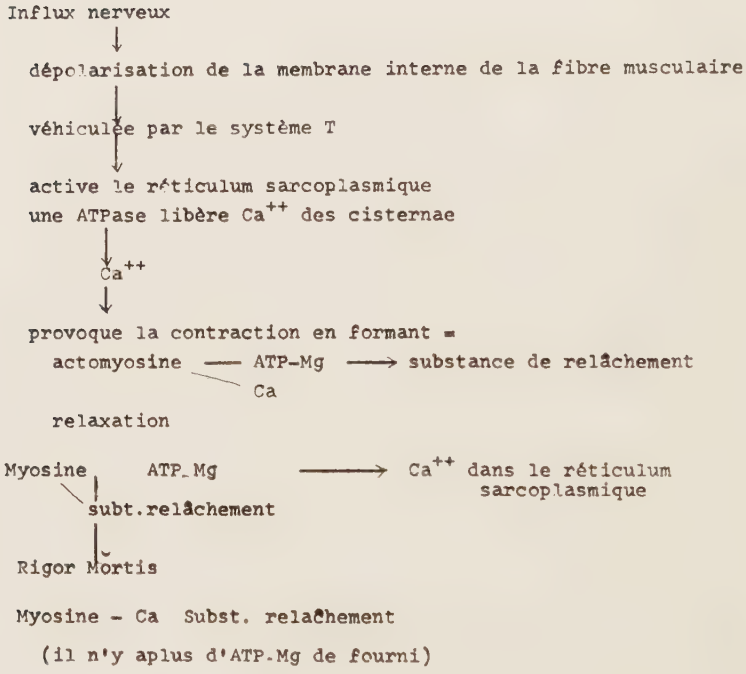
Ce phénomène dépend aussi d'une activité ATPasique. Nous avons vu que la contraction musculaire nécessite une hydrolyse continue de l'ATP, l'ATPase myofibrillaire ayant été transformée d'ATPase inhibée par les ions Mg^{2+} en ATPase activée par ces ions. Ainsi tous les agents capables d'effectuer la transformation inverse suppriment la contraction (E.D.T.A., facteur de relâchement). La découverte d'un facteur, présent dans la fibre musculaire, qui possédait ces propriétés, incombe à MARSH et BENDALL. Ce facteur relaxant est soluble et de nature phospholipidique. Cette substance est détruite par la phospholipase C (BRIGGS).

Après l'excitation, les ions Ca^{2+} sont repris par le réticulum sarcoplasmique au niveau des vésicules de 0,1 à 0,3 μ contenant la substance relaxante et supportant une activité ATPasique. Ces vésicules sont douées d'une intense activité et peuvent épurer le milieu des ions Ca^{2+}.

La combinaison des activités de l'ATPase et de la substance relaxante permet d'obtenir la décomposition du complexe actomyosine. S'il reste de l'ATP dans le milieu, sans les ions Ca^{2+}, le muscle possède sa souplesse naturelle et le glissement interfilamentaire est possible (GERGELY).

Les ATPases sont donc présentes partout où il y a une demande d'énergie, cependant on peut dire que leur rôle majeur concerne la contraction musculaire, créant la liaison entre les processus métaboliques et les processus mécaniques. Nous avons voulu mettre en évidence les différents types de fibre musculaire en révélant l'activité ATPasique des myofibrilles. En effet, nous avons vu que les ATPases des fibres de type rouge sont détruites à des pH alcalins alors que les ATPases des fibres de type blanc ne sont pas altérées. Par contre, à des pH acides, nous obtenons l'inverse. Nos méthodes seront effectuées à des pH différents nous permettant d'établir la classification des fibres à l'intérieur d'un muscle.

SCHEMA DU CYCLE CONTRACTION-RELAXATION MUSCULAIRE



d'après BOGLER (J. Gén. Physiol. 1954, 38, 159)

MÉTHODES HISTOCHIMIQUES DE RÉVÉLATION DE L'ACTIVITÉ ATPasique MYOFIBRILLAIRE DANS LE MUSCLE STRIÉ

Les ATPases sont des « ferments » particulièrement labiles et l'établissement d'une méthode histochimique soulève des problèmes de fixation très délicats et, comme toute enzyme, sa dénaturation survient très vite après son isolement d'un tissu vivant; ces caractères expliquent le choix de notre méthode par congélation et les prélèvements sont pratiqués sur un animal venant d'être abattu.

Les méthodes histochimiques dérivent des techniques histologiques, l'analyse portant sur le tissu intact, la structure et les rapports morphologiques sont respectés autant que possible. Le microscope sert comme instrument d'investigation, nous permettant d'interpréter les réactions chimiques. Les révélateurs chimiques doivent évidemment conserver l'intégrité structurale au tissu étudié et provoquer, lors de positivité, une manifestation optique ou photographique.

Intégrité du tissu étudié

Pour pouvoir lire le résultat de la réaction, il est nécessaire de pratiquer des coupes fines du tissu. Afin de pouvoir étendre les investigations structurales à toute la fibre musculaire, nous effectuons des coupes transversales sériées.

Avant d'effectuer ces coupes, il est nécessaire de fixer les structures, ainsi les composants cellulaires restent « in toto ».

Les ATPases étant solubles, mais faisant partie d'un édifice macromoléculaire, la fixation aura pour but de consolider cette disposition spatiale labile en créant des liaisons entre molécules voisines.

Il est à noter que l'activité ATPasique est presque

complètement inactivée par l'acétone, le toluène et l'inclusion à la paraffine. La fixation au formol calcique réduit également de 85 à 90 % l'activité ATPasique (Novikoff). C'est la raison pour laquelle nous avons choisi comme fixateur le froid.

Congélation du tissu frais

Cette méthode possède une très grande rapidité d'action permettant une immobilité instantanée et définitive des constituants des tissus. Les changements chimiques dans les tissus sont réduits au minimum.

Il existe toutefois des inconvénients. On peut observer la formation de cristaux de glace entraînant une redistribution dans le protoplasme des substances dissoutes et des altérations de la structure cellulaire. Pour remédier à cela il faut pratiquer une congélation très rapide.

Un second inconvénient existe : dès que les coupes sont dégelées, elles deviennent informes, gluantes, donc inutilisables. Pour éviter cet inconvénient, les coupes ne sont pas décongelées, le microtome étant dans une atmosphère refroidie, la lame du rasoir est ainsi froide et les coupes ne dégèlent pas à son contact.

Description des différentes étapes

L'animal est sous anesthésie générale (éther, pour le rat).

On dissèque la région des muscles intéressés.

On effectue un prélèvement de petites dimensions (2 × 3 mm) que l'on maintient sur une rondelle de liège de 3 mm d'épaisseur à l'aide d'une couche de gomme adragante.

On immerge le tout dans de l'isopentane liquide, refroidi par de l'azote liquide. L'isopentane pénètre très rapidement le tissu, permettant une congélation rapide. La température de l'isopentane est de — 140°C. L'échantillon reste une dizaine de secondes dans l'isopentane (on remue le prélèvement dans l'isopentane).

— L'échantillon est repris et on le place dans un récipient clos (en plastique) que l'on met dans un congélateur (— 25° à — 40°C) pendant 12 heures environ. On obtient ainsi

l'équilibre thermique de l'échantillon. Le cryostat étant lui-même à — 25°C, il n'y aura pas de réactions thermiques.

— On pratique les coupes. La rondelle de liège portant l'échantillon est maintenue sur un porte-objet spécial qui se fixe au microtome. Le cryostat et le rasoir sont à une température de — 25°C, à une température plus basse, les coupes sont dilacérées, car elles attachent au rasoir. Les coupes ont une épaisseur de 5 à 10 μ environ et sont recueillies sur une lamelle (en son centre si possible).

On effectue ainsi une série de coupes.

— Les coupes sont conservées à une température de — 4°C pendant 12 heures environ, on obtient ainsi une meilleure adhérence des coupes aux lamelles et une surface plus plane.

— Enfin, on pratique, quand les coupes sont dégelées et sèches, les techniques de révélations ATPasiques.

Les réactions ATPases

Les réactions visent à révéler l'activité de l'ATPase alcaline myofibrillaire des fibres musculaires.

Les premières tentatives de détection histochimique de l'activité ATPasique sont dues à Glick et Fisher (45, 46), Soulairac et Desclaux (49), Gomori (41). Glick et Fisher auraient localisé l'activité de l'alcaline phosphatase au lieu de l'ATPase d'après Moog et Steinbach. Cette interférence est due au fait qu'ils ont utilisé l'ATP comme substrat.

Des progrès considérables dans le pourcentage de réussite sont dus à Padykula, Herman, par leur introduction du contrôle de l'activité ATPasique par des activateurs et des inhibiteurs spécifiques (1955). Wachstein, Meisel ont élaboré une autre technique différant surtout par la capture des ions. Les deux techniques dérivent de celle de Gomori au glycérophosphate de sodium, mais la capture des ions phosphates se fait au calcium dans la technique de Padykula-Herman, au plomb dans celle de Wachstein-Meisel. La première technique révèle 20 % de l'activité ATPasique, la seconde 15 %.

Beaucoup d'améliorations sont encore nécessaires afin d'obtenir de meilleures révélations de l'activité ATPasique.

Nous allons décrire différentes méthodes, parmi les plus connues, nous terminerons notre exposé par la méthode que nous avons choisie et adaptée.

MÉTHODE DE PADYKULA-HERMANN (1955)

Méthode calcique

Les coupes sont congelées et non fixées.

— *Milieu incubateur :*

La solution est fraîchement préparée.

On prend 20 ml d'une solution de véronal sodique à 0,1 Mole (2,062 g pour 100 ml) auxquels on ajoute 10 ml d'une solution de chlorure de calcium concentrée à 0,18 Mole (1,998 g pour 100 ml).

On ajoute au mélange 30 ml d'eau distillée. On additionne à ce mélange 152 mg d'ATP sous forme de sel disodique. Dès que l'ATP est dissout, on ajuste le pH à 9,4 à l'aide d'une solution de soude concentrée à 0,1 M.

On complète pour 100 ml avec de l'eau distillée. On filtre si le liquide est trouble.

— *Technique :*

On incube entre 5 minutes et 3 heures à 37°C.

On lave avec des solutions à 1 % de $CaCl_2$ (3 bains).

On fait un transfert avec des solutions à 2 % de chlorure de cobalt pendant 3 minutes.

On lave à l'eau distillée avec soin.

On développe dans du sulfure d'ammonium jaune dilué.

On lave, on colore le fond (carmalun, laque aluminique de rouge nucléaire sodique).

On déshydrate à l'alcool absolu, éclaircir par un hydrocarbure benzénique.

On monte en milieu synthétique (résine, baume du Canada).

— *Résultats :*

L'activité ATPasique est révélée par un dépôt noir. On obtient une bonne localisation.

MÉTHODE DE WACHSTEIN-MEISEL

Méthode au plomb

Les coupes sont gelées et non fixées. Ou bien coupes fixées au formol : tissu frais aussitôt plongé dans le milieu incubateur, puis fixé au formol à 10 % pendant 30 minutes.

— *Milieu incubateur :*

20 ml d'une solution d'ATP sous forme de sel disodique à une concentration de 8,3 10^{-4} M (125 mg/100 ml).

20 ml d'une solution de « tris » HCl à froid à pH = 7,2, concentration : 8 10^{-2} M.

On ajoute 3 ml de solution à 2 % de nitrate de plomb (3,6 10^{-3} M).

5 ml de solution à 0,1 M de sulfate de magnésium (10^{-2} M).

2 ml d'eau distillée.

On ajuste le pH à 9,4 si c'est nécessaire.

— *Technique :*

Incuber les coupes pendant 5 à 60 minutes.

Rincer à l'eau distillée.

On développe avec une solution à 1 % de sulfure d'ammonium jaune pendant 1 minute.
On rince à nouveau à l'eau distillée.

On monte sur un gel glycériné.

— *Résultats :*

L'activité ATPasique est révélée par un précipité brun-marron dû au sulfure de plomb.

MÉTHODE DE MAENGWYN ET DAVIES

Méthode calcique

Sur des coupes congelées non fixées.

— *Milieu incubateur :*

Préparation juste avant l'emploi :

0,8 M de glycérol
0,4 M de chlorure de potassium

12 ml de solution d'acétate sodique saturée,
3,6 ml d'une solution à 0,36 M de chlorure de calcium (moles de K OH dans 0,6 ml),

0,04 M ATP sodique,
13,8 ml d'eau distillée,
0,3 ml de phosphate disodique saturé.

On ajuste le pH à 9,9 avec K OH (dans 0,6 ml). Si le liquide est trouble, le filtrer pendant 1 heure à 37°C.

— *Méthode :*

On incube les coupes de 10 à 15 μ de 5 minutes à 3 heures.

On lave trois fois avec une solution à 1 % de $CaCl_2$ et 75 % éthanol.

Transfert de 2 % de $CaCl_2$ pendant 3 minutes.

On développe dans 1 % de sulfure d'ammonium jaune.

On lave.

On déshydrate.

On met en milieu synthétique pour observation.

— *Résultats :*

L'activité ATPasique est révélée par un précipité brun-noir.

La méthode que nous avons choisi dérive de celle de King-Engel réadaptée par Fardeau.
C'est une méthode calcique.

— *Milieu incubateur :*

2 ml de véronal sodique à 0,1 M (2,062 g/100 ml),
1 ml de chlorure de calcium à 0,18 M (1,998 g/100 ml),
7 ml d'eau distillée (pH 5,5),

15 mg d'ATP.

Le pH de cette solution est souvent situé vers 8,2, on le réajuste à 9,4 à l'aide d'une solution normale de soude.

— *Technique :*

Incuber pendant 10 minutes à 37°C.

Laver à l'eau bidistillée, on effectue trois bains d'une minute chacun.

Passer dans du chlorure de cobalt à 2 % pendant trois minutes.

On lave à l'eau bidistillée, avec soin, trois bains d'une minute chacun.

On passe la coupe dans une solution de sulfure d'ammonium diluée, pendant 30 secondes.

Lavage à l'eau bidistillée, trois bains d'une minute chacun.

On déshydrate les préparations et on les monte dans le baume du Canada.

Nous suivons également une deuxième technique pour révéler l'activité ATPasique à pH 9,4. On se sert du même milieu incubateur, mais on ajuste son pH à 9,4 sans avoir ajouté l'ATP. On immerge les coupes pendant 5 minutes. On les rince à l'eau bidistillée. On les incube à nouveau dans la solution à pH 9,4 dans laquelle on a ajouté 15 mg d'ATP. Les coupes y séjournent 30 minutes à 37°C. Le reste des opérations est identique à la technique précédente.

Nous ne nous sommes pas limités à révéler l'activité ATPasique alcaline et nous mettons en évidence les ATPases acides à l'aide de la technique suivante :

Les préparations sont plongées pendant 10 minutes dans une solution tampon à pH 4,36.

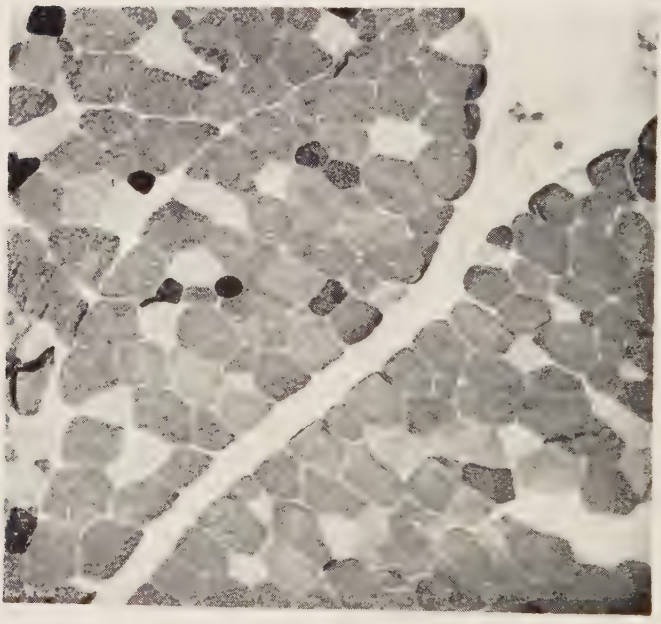
Nous l'obtenons en mélangeant 13 ml d'acide acétique en solution à M/5 et 7 ml d'une solution d'acétate de sodium à M/5.

Ensuite, les préparations subissent le même traitement que lors d'une révélation ATPasique alcaline. Elles sont plongées dans le milieu incubateur à pH 9,4 pendant 30 minutes, puis subissent les autres étapes.

— *Résultats :*

Les ATPases sont révélées par un précipité noir plus ou moins intense suivant l'activité ATPasique du type des fibres.

Ci-dessous une de nos photographies :
(grossissement × 90)



Les fibres apparaissant en noir sont du type rouge,
celles apparaissant en gris sont du type blanc,
celles apparaissant en blanc sont du type intermédiaire.

CONCLUSION

Au cours de cette étude, nous avons mis en place les différents constituants du muscle strié squelettique, tant du point de vue morphologique que biochimique. La mise en évidence de leurs modifications et de leurs interactions lors de la contraction musculaire et de la relaxation nous a permis de souligner le rôle important des transporteurs d'énergie et tout particulièrement de l'acide adénosine triphosphorique. Ce composé se trouve constituer, en effet, le lien entre les différentes réactions catalytiques d'une part et d'autre part les protéines contractiles et les échanges ioniques. Cela se traduit par l'importante activité adénosine triphosphatasique de certaines structures cellulaires : mitochondries, réticulum sarcoplasmique et surtout myofilaments.

La mise en évidence histoenzymologique de cette activité permet de préciser certaines caractéristiques du fonctionnement musculaire et de classer les fibres en plusieurs catégories.

On peut espérer que l'application de cette technique à des muscles porteurs de lésions, permettra de contribuer à une meilleure compréhension de la pathogénie de certaines affections musculaires.

Vu : le Professeur de l'Ecole Vétérinaire
rapporteur :

G. VAN HAVERBEKE

Vu : le Directeur de l'Ecole Vétérinaire
Pour le Directeur,
Le Professeur délégué,

R. LAUTIE

Vu : le Président de la Thèse

GUILHEM

Vu et permis d'imprimer,
Toulouse, le 18 novembre 1971,
Le Président de
l'Université Paul-Sabatier

L. LARENG

BIBLIOGRAPHIE

Arnold (H.) et Pette (D.). — Binding of glycolytic enzymes to structure proteins of muscle. *Europ. J. Biochem.*, 1968, 6/2, 163-171.

Bacetti (B.). — Nouvelles observations sur l'ultrastructure du myofilament. *J. Ultrastruct. Res.*, 1965, *13*, 245-256.

Bloom (W.) et Fawcett (D.W.). — A textbook of histology, 9e edt. W.B. Saunders Cie, 1968.

Bouin (P.). — Eléments d'Histologie. Librairie Félix Alcan, vol. 1, 1929.

Chaudry (I.H.) et Gould (M.K.). — Evidence for the uptake of ATP by rat soleus muscle in vitro. *Biochem. Biophys. Acta*, 1970, 196/2, 320-26, 327-335.

Chevremont (M.). — Notions d'histologie et de cytologie, 2e edt. Liège, Desoer, 1966.

Dubowitz (V.). — Developing and diseased muscle. Edt. H. John Walton, 1968, *4*, 28.

Eisenhardt (R.H.) et Rosenthal (O.). — Studies of energy transfer in mitochondrial oxidative phosphorylation. III. On the interaction of adenosine diphosphate with high energy intermediate. Harrisson Dept. of Surg. Res. Univ. of Pennsylvania Sch. of Red. Philadelphia P.A. Biochemistry, Washington, 1968, 7/4, 1327-1333.

Gabe (M.). — Techniques histochimiques. Edit. Masson, 1968.

Gergely (J.). — Disorders of voluntary muscle. Edt. John H. Walton, 1969.

Grossman (I.W.) et Heitkamp (D.H.). — Electron microscopic localisation of mitochondrial adenosine triphosphatase activity. *J. Histochem. Cytochem.*, 1968, 16/10, 645-653.

Guth (L.) et Samaha (F.J.). — Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp. Neurol.*, 1969, 25/1, 138-152.

Gutmann (E.). — Basis muscle type differenciation. Exploratory concepts in muscular dystrophy. *Excerpta Med. Foundation*, 132-141.

Hermann (H.) et Cier (J.F.). — Précis de physiologie. Edit. Masson, 1968, t. 1, fasc. 2.

Huxley (H.E.). — The mechanism of muscular contraction. *Scientific American*, 1965, *213*, 18-27.

Jagendorf-Elfvin (M.). — Ultrastructure of the contraction relaxation cycle of glycerated rabbit psoas muscle. *J. Ultrastruct. Res.*, 1967, *17*, 348-400.

Kayser (C.). — Physiologie, système nerveux et muscle. T. 2. Edit. Flammarion, 1969.

Kolb (E.). — Physiologie des animaux domestiques (traduction de C. Labie). Edit. Vigot, Paris, 1965.

Levrat (B.). — Contribution à l'étude des cholinestérases et de leur conservation dans la synapse myoneurale du tissu musculaire strié squelettique. *Th. Doct. Vét.*, Lyon, 1968.

Lison (L.). — Histochimie et cytochimie animales. Edit. Gauthier-Villars, 1960.

Louisot (P.). — Biochimie métabolique. Simep, édit., 1969, t. 1.

Malmejak (J.). — Eléments de physiologie, 4e édit. Paris, Edit. Médicales, Flammarion, 1969.

Martineau et Pinset-Harström. — Interactions spécifiques de l'actomyosine avec les ions Mg^{++} et $Ca^{2+}{}^{+}$ étudiées au microscope électronique. *J. Ultrastruct. Res.*, 1969, *26*, 251-261.

Meyerhof (O.). — Chimie de la contraction musculaire, traduit et annoté par L. Genevois, Bordeaux, 1932.

Padykula (Helen A.) et Gauthier (G.F.). — Exploratory concepts in muscular dystrophy and related disorders. Ed. Millorat (AT), N.Y., 1966, 117-131.

Padykula (H.A.) et Gauthier (G.F.). — Cytochimical studies of adenosine triphosphatase in skeletal muscle fibers. *J. Cell. Biol.*, 1967, *18*, 87.

Paragon (B.). — Ultrastructure de la fibre musculaire striée squelettique des Mammifères. *Th. Doct. Vét.*, Toulouse, 1971.

Pearse (E.). — Histochemistry. Ed. J.A. Churchill Ltd., Londres, 1961.

Perrot (F.). — Contribution à l'étude du diamètre et du métabolisme énergétique de la fibre musculaire striée des Bovins. *Th. Doct. Vét.*, Lyon, 1968.

Policard (A.). — Précis d'histophysiologie. Edit. Doin, Paris, 1950.

— Eléments de physiologie cellulaire. Edit. Masson, 1966.

Polonovski, Boulanger, Machebœuf, Roche. — Biochimie médicale. Edit. Masson, 1967.

Polonovski (M.), Boulanger (P.), Tayeau (F.), Mandel (P.) et Biserte (G.). — Biochimie médicale, fasc. III, 8e édit. Masson, édit., 1971, 357-379.

Sandborn (Edmund B.). — Cells and tissues by light and electron microscopy. *N.Y. and London Academic Press*, 1970, 296-311, vol. 1.